

**Publication number:** JP7132092 (A)  
**Publication date:** 1995-05-23  
**Inventor(s):** HAGIWARA KIYOSHI  
**Applicant(s):** NORINSUISANSOHO NOGYO SEIBUTSU  
**Classification:**  
- international: C12N15/09; C07K14/415; C07K14/42; C12N1/21; C12R1/19; C12N15/09;  
C07K14/415; C12N1/21; C07K14/415; (IPC1-7): C07K14/42; C12N15/09; C12N1/21;  
C12N1/21; C12R1/19  
- European:  
**Application number:** JP19930305988 19931111  
**Priority number(s):** JP19930305988 19931111

**PURPOSE:** To provide a new gene useful for producing insect-resistant crop, also valuable for varietal gene analysis or as a marker for genome analysis. **CONSTITUTION:** The objective gene having a base sequence coding the amino acid sequence of a lectin-like protein in Kentucky wonder, a variety of kidney bean (e.g. a gene 1211 bp in length of formula I or II). This gene can be obtained by chemical synthesis of a primer based on an appropriate sequence of the lectin-like protein and by cloning from the genomic DNA by PCR method.

[illegible]

<http://v3.espacenet.com/publicationDetails/biblio?adjacent=true&KC=A&date=19950523...> 3/13/2009

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-132092

(43)公開日 平成7年(1995)5月23日

|                          |       |         |                |                            |
|--------------------------|-------|---------|----------------|----------------------------|
| (51)Int.Cl. <sup>6</sup> | 識別記号  | 庁内整理番号  | F I            | 技術表示箇所                     |
| C 1 2 N 15/09            | Z N A | 7236-4B |                |                            |
| 1/21                     |       | 8318-4H |                |                            |
| // C 0 7 K 14/42         |       |         |                |                            |
| (C 1 2 N 1/21            |       | 9050-4B | C 1 2 N 15/ 00 | Z N A A                    |
|                          |       | 審査請求    | 未請求            | 請求項の数 5 F D (全 6 頁) 最終頁に続く |

(21)出願番号 特願平5-305988

(22)出願日 平成5年(1993)11月11日

(71)出願人 591127076

農林水産省農業生物資源研究所長  
茨城県つくば市観音台2丁目1-2

(72)発明者 萩原 清

茨城県つくば市観音台2丁目1の2 農林  
水産省 農業生物資源研究所内

(74)代理人 弁理士 友松 英爾 (外1名)

(54)【発明の名称】 新規ないんげん豆遺伝子

(57)【要約】

【目的】 耐虫性作物を作出するための、あるいはいんげん豆ゲノム解析及びいんげん豆品種間の遺伝分析をするための、いんげん豆の品種名ケンタッキーワンダーのレクチン様蛋白質遺伝子の単離と、その構造を解析することにある。

【構成】 いんげん豆の品種名ケンタッキーワンダーのレクチン様蛋白質のアミノ酸配列をコードしている塩基配列を有することを特徴とする遺伝子。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 いんげん豆の品種名ケンタッキーワンダーのレクチン様蛋白質のアミノ酸配列をコードしている塩基配列を有することを特徴とする遺伝子。

【請求項2】 前記塩基配列が図1、2、3に示されたものである請求項1記載の遺伝子

【請求項3】 請求項1または2記載の遺伝子を含むことを特徴とするベクター。

【請求項4】 請求項1または2記載の遺伝子が組み込まれたことを特徴とする生物。

【請求項5】 請求項1または2記載の遺伝子のプロモーター領域のDNA鎖。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、いんげん豆の品種名ケンタッキーワンダーのレクチン様蛋白質クローン化DNA、その断片並びに、上記のクローン化DNAまたは断片が組み込まれたプラスミド、または、植物、動物、微生物に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 いんげん豆には、アズキゾウムシなどに対して耐虫性をもたらす因子である $\alpha$ -アミラーゼインヒビターが含まれている。この $\alpha$ -アミラーゼインヒビターのうちの一つは、近年いんげん豆の品種テンダーグリーンよりクローニングされ、遺伝子レベルでもその構造が明らかとなった。その結果、遺伝子としてはレクチン様蛋白質遺伝子の一部としてコードされていることがわかっている〔L. Mホフマン (L. M. Hoffman) 分子及び応用遺伝学 (J. Mol. Appl. Genet.) 1984年 2巻 447ページから453ページ〕。従って、耐虫性 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターは遺伝子としては、レクチン様蛋白質であると言える。このレクチン様蛋白質遺伝子、 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター、および耐虫性との関連は古くより詳細に検討されてきた。しかしながら、 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターとして総称される蛋白質は、いんげん豆で多くの種類が検出される。そのうちのいくつかのものは、もともと1種類のものが修飾を受けた結果多くの種類の $\alpha$ -アミラーゼが検出されるであることがわかっているが〔ジャクイン・モレノとマーチン・J・クリスピールス (Joaquin Mereno and Maarten J. Chrispeels)、プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス オブ ザ USA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 1989年 86巻 第7885ページから7889ページ〕、まだ未発見のレクチン様蛋白質遺伝子及び $\alpha$ -アミラーゼインヒビター遺伝子も多数存在すると推定される。また、いんげん豆では遺伝子が分子レベルで解析されているものは少なく、品種間差のある遺伝子はほとんど見いだされてな

い。従って、品種の遺伝子分析やゲノム解析のマーカーとして利用可能な遺伝子はほとんどない現状である。そして、すでにクローニングされているいんげん豆の品種名テンダーグリーンのレクチン様蛋白質の他には、耐虫性 $\alpha$ -アミラーゼの遺伝子をコードするDNAはクローニングされておらず、またいんげん豆の場合は、品種特異的遺伝子マーカーもない。従って、新規のレクチン様蛋白質遺伝子をクローニングできれば、耐虫性作物の作出に有用のみならず、品種の遺伝子分析やゲノム解析のマーカーとしても有用である。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、耐虫性作物の作出に必要な耐虫性遺伝子を豊富化するとともに、この遺伝子を組み込んだ新しい生物を提供する点にある。本発明の他の目的は、この新規遺伝子を品種の遺伝子分析やいんげん豆ゲノム解析用マーカーとして利用する道を提供する点にある。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、前記課題解決のために鋭意研究を重ねた結果、いんげん豆の品種名ケンタッキーワンダーのレクチン様蛋白質遺伝子のクローニング及び塩基配列の解析に成功し、このいんげん豆の品種名ケンタッキーワンダーのレクチン様蛋白質のアミノ酸配列をコードしている塩基配列が、いんげん豆の品種テンダーグリーンのそれと較べて、かなり異った配列を持つものであり、そのホモロジーは約71%であることを発見し (図5参照)、本発明に至ったものである。ちなみに、いんげん豆の品種名大正金時のレクチン様蛋白質のアミノ酸配列をコードしている塩基配列は、いんげん豆の品種テンダーグリーンのそれと較べてそのホモロジーは約99.8%であり (図4参照)、ほぼ同一の遺伝子であった。

【0005】 すなわち、本発明の第1は、いんげん豆の品種名ケンタッキーワンダーのレクチン様蛋白質のアミノ酸配列をコードしている塩基配列を有することを特徴とする遺伝子に関する。

【0006】 本発明の第2は、前記遺伝子を含むベクターに関する。

【0007】 本発明の第3は、前記遺伝子が組み込まれた生物に関する。前記生物は植物、動物または微生物を意味する。

【0008】 本発明の遺伝子は、つぎのようにして得ることができる。すなわち、前記遺伝子はレクチン様蛋白質の適当な配列をもとにしたプライマーを化学合成し、これを用いてゲノミックDNAよりポリメリゼーション・チェーン・リアクション法によりクローニングできる。また、既知の遺伝子か新規遺伝子であるかの区別は、得られた遺伝子の電気泳動法による分子量測定により推定できる。さらに、蛍光色素を用いた、ポリメリゼーションチェーンターミネーション法等により、DNA

3

の全塩基配列決定を行うことができ、これにより新規遺伝子であることを確認した。得られた遺伝子を構造解析した結果、テンダーグリーン・のレクチン様蛋白質の遺伝子とホモロジーを有しており、このことが、得られた遺伝子がいんげん豆の品種名ケンタッキーワンダーのレクチン様蛋白質の遺伝子であることの確証となった。この塩基配列は電子出願上1つの図ではおさまらないので図1～3に分けて記載した。

【0009】第3番目の本発明である前記DNA鎖を含む生物はつぎのようにして製造することができる。すなわち、本発明の遺伝子を適当な植物用発現ベクター、例えばPBI 121 (クローンテック社製)、BIN19 (Nucleic Acid Research, 12, 8711-8721, 1982年)、などに接続することにより、植物等でいんげん豆・ケンタッキーワンダーのレクチン様蛋白質を生産させる発現ベクターを構築することができる。このようにして、いんげん豆・ケンタッキーワンダーのレクチン様蛋白質遺伝子を連結して構築した発現ベクター、例えばアグロバクテリウムによる植物の形質転換法などによって、例えばタバコ、ジャガイモ、アラビドプシス、アスパラガス、トマト、あずき等に導入し、遺伝子組換え植物を作製できる。また例えばエレクトロポレーション法、例えばパーティクルガン法によって、例えばダイズ、イネ、トウモロコシ等の植物、動物または微生物に、直接遺伝子を導入し、形質転換植物を作製することができる。またさらに、植物等に導入したい遺伝子を、いんげん豆・ケンタッキーワンダーのレクチン様蛋白質遺伝子のプロモーター部分に連結し、前記と同様の植物等への遺伝子導入の手法を用いて導入すれば、組織特異的発現のプロモーターとして使用できる。

【0010】

【実施例】

(a) いんげん豆DNAの調製

いんげん豆の品種名ケンタッキーワンダー、大正金時を含む4種類のいんげん豆の品種についてDNAの抽出を行った。豆より、セチル・トリメチル・アンモニウム・ブロミド法 (CTAB法) を用いてDNA調製を行った。以下にその操作を示す。いんげん豆10gを乳鉢で荒く摩砕後コーヒーマルで粉末になるまでで摩砕した。豆粉末に50mlの緩衝液 (2%セチル・トリメチル・アンモニウム・ブロミド; 0.1Mトリス-HCl, pH8.0; 1.4M NaCl; 1%ポリビニルピロリドン) を加えて攪拌し、さらに50mlのクロロホルム・イソアミルアルコール混合液 (クロロホルム24に対してイソアミルアルコール1の比率) を加えさらに攪拌する。その後遠心分離機で遠心分離し、上清部に再び50mlのクロロホルム・イソアミルアルコール混合液 (クロロホルム24に対してイソアミルアルコール1の比率) を加えさらに攪拌する。その後再び遠心分離機で

4

遠心分離し上清部に4mlの10%セチル・トリメチル・アンモニウム・ブロミドを加え、さらに等容積の沈殿用緩衝液 (1%セチル・トリメチル・アンモニウム・ブロミド; 5mMトリス-HCl, pH8.0; 10mMEDTA) を加え攪拌後、遠心分離機で遠心分離する。遠心沈殿部に緩衝液 (10mMトリス-HCl; 1mMEDTA; pH8.0) 5mlを加え、溶解後エタノール沈殿を行い、DNA標品とした。この操作の結果4種類のいんげん豆より4種類のDNAを得た。

【0011】 (b) いんげん豆のDNAよりレクチン様蛋白質のDNAのクローニング。

実施例 (a) によって得られたいんげん豆DNAを材料としてポリメリゼーション・チェイン・リアクション反応を行った。反応条件は、DNA変性ステップ: 95℃、1分、DNAアニール: 55℃、2分、ポリメリゼーション反応: 72℃、3分、これを25サイクル行った。反応スケールは50μlで、1サンプルにつき3つ反応を行った (3×50μl)。反応物を分析した結果、おのおのの品種のいんげん豆のDNAよりいんげん豆のレクチン様蛋白質をコードすると推定されるDNA断片が得られた。この得られたDNA断片を0.8%アガロースを用いる電気泳動法により、分子量の推定を試みた結果、いんげん豆のうち、品種名ケンタッキーワンダーのレクチン様蛋白質遺伝子が、分子量に特に大きな変異があることが判明した。

【0012】 (c) クローン化ケンタッキーワンダーレクチン様蛋白質のDNA塩基配列の決定。

実施例 (b) によって得られたレクチン様蛋白質をコードするDNA断片のうち、品種名ケンタッキーワンダーおよび大正金時由来のDNA断片について、PUC19プラスミドに組み込んだ。このレクチン様蛋白質をコードするDNA断片をPUC19プラスミドに組み込んだプラスミドを大腸菌JM103ストレインに導入し、この大腸菌を増殖し、これよりアルカリ-SDS法を用いてプラスミドDNAを抽出精製した。その結果このプラスミドを大量に増幅することに成功し、以降の実験に用いた。

【0013】 DNA塩基配列の決定は、前記のプラスミド約1μgを材料として、プライマーとしては、東洋紡績株式会社製のM13フォワード、リバースプライマーおよび3種類のカスタムプライマーを用いた。塩基配列決定反応は、ABI社製のダイターミネーターDNA塩基配列決定用試薬キットを用いて、ABI社指定のマニュアルに従い反応を行った。さらに反応物は緩衝液 (トリス-HCl・1mMEDTA・pH8.0) にて平衡化したバイオラッド社製バイオゲルP30 (400μl) により、ゲルろ過精製を行い、未反応物等を除去し、エタノール沈殿を行った。このサンプルをABI社製DNAシーケンサーを用いて電気泳動と遺伝子塩基配列決定を行った。DNAとしては、いんげん豆の品種名ケンタ

5

ッキーワンダーおよび大正金時の2種類についてDNA全塩基配列の決定を行った。

【0014】(d) 遺伝子の解析。

実施例(c)によって決定された、いんげん豆のレクチン様蛋白質をコードするDNA断片の塩基配列の解析を行った結果、いんげん豆の品種名大正金時の遺伝子は、既知のいんげん豆の品種名テンダーグリーンのレクチン様蛋白質をコードするDNAとほぼ完全に一致した(99.8%の一致)。このデータは図4に相同性プロットとして示す。しかしながら、いんげん豆の品種名ケンタッキーワンダーのレクチン様蛋白質は71%の相同性を示し、大正金時やテンダーグリーンのレクチン様蛋白質とは異なる遺伝子である。この結果は、図5に相同性プロットとして示す。しかも十分な相同性を示すことからレクチン様蛋白質であることは、明らかで、新規なレクチン様蛋白質遺伝子であることが確認された。

【0015】

【発明の効果】本発明は、いんげん豆のうちの1つの変種であるケンタッキーワンダーに、従来のテンダーグリーンのものとは遺伝子配列の異なる新たなレクチン様蛋白質遺伝子を見出し、クローニングに成功し、さらに全塩基配列を決定した。この遺伝子は、新規耐虫性遺伝子としての利用が期待される。またその上流部分の塩基配列は、従来のレクチン様蛋白質のプロモーターと著しく

6

異なるので新規プロモーター配列として産業上有用な利用が期待される。さらにこれらの結果、レクチン様蛋白質遺伝子は、いんげん豆の品種間において構造に違いがあることがわかった。この違いより、このレクチン様蛋白質遺伝子は、いんげん豆のゲノム解析あるいはいんげん豆の品種の遺伝解析のDNAマーカーとしても有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のいんげん豆の品種名ケンタッキーワンダーのレクチン様蛋白質のアミノ酸配列をコードしている塩基配列の一部を示す。

【図2】本発明のいんげん豆の品種名ケンタッキーワンダーのレクチン様蛋白質のアミノ酸配列をコードしている塩基配列の一部(図1のつづき)を示す。

【図3】本発明のいんげん豆の品種名ケンタッキーワンダーのレクチン様蛋白質のアミノ酸配列をコードしている塩基配列の一部(図2のつづき)を示す。

【図4】いんげん豆の品種名大正金時とテンダーグリーンのLLP遺伝子の相同性プロットを示す。重なっているところが同一であることを意味している。

【図5】いんげん豆の品種名ケンタッキーワンダーとテンダーグリーンのLLP遺伝子の相同性プロットを示す。重なっているところが同一であることを意味している。

【図1】

|     |                        |                        |     |     |
|-----|------------------------|------------------------|-----|-----|
| 5'  |                        | 20                     |     | 40  |
| 1   | GCTCTTTCACATGTGTCTTC   | CTCTCACTTCTCACTGCTACG  |     |     |
| 41  | TGCAACCCGCTTCTCTCCA    | TAAATATCTCTTCAACTTTAA  | 60  | 80  |
| 81  | ACTAATTATTTTATATTTT    | TTCAATGTTTCTGATGACGTG  | 100 | 120 |
| 121 | GATGCAATTGCCATCGTTGC   | TTAATTCTTATTTTATATTC   | 140 | 160 |
| 161 | TTATTTCTCCCTCAAATAA    | TATTACAAAAGAAAAAAGTT   | 180 | 200 |
| 201 | AATCACTTCGAAAACACGTG   | TTTATAAACAAAACGAAAGAA  | 220 | 240 |
| 241 | AAAAGTTTCGAAAAGTTTTTG  | CAGTTGTTGTTGTATATAATAG | 260 | 280 |
| 281 | AGAAAGAGAGTGATGGTTAA   | TGCATGAATGCATACATGGCT  | 300 | 320 |
| 321 | TCCTCCAACCTTACTCTCCG   | TAGGCGTCTTCTCTTGGGCTTC | 340 | 360 |
| 361 | TCACCCCTCGGAAAACCTCAGC | CACCGAAAACCTCCTTCAATAT | 380 | 400 |

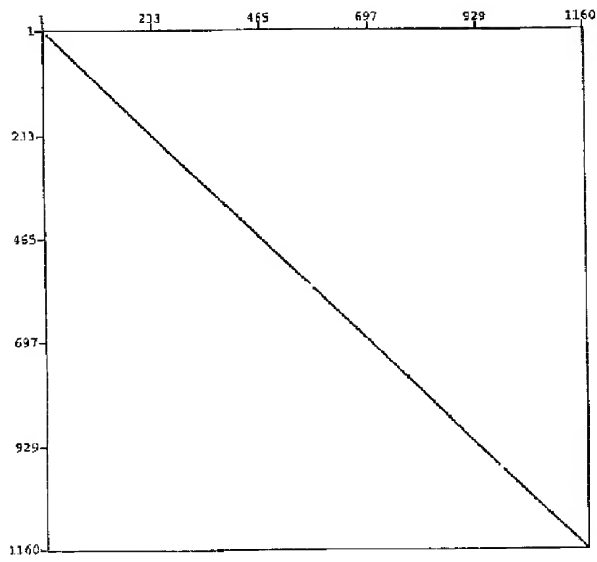
【図2】

|     |                       |     |                        |     |     |
|-----|-----------------------|-----|------------------------|-----|-----|
| 401 | CGATGGGTTTCAACAAAACC  | 420 | AACCTTATCCTTCAAGGC     | 440 | GAT |
| 441 | GCCATCCTCTCATCGAACG   | 460 | GCAACTTACAACCTACCCTATA | 480 |     |
| 481 | ATTCTATACGACTCTATGAG  | 500 | CAGAGCCTTCTACTCCGCCCC  | 520 |     |
| 521 | CATCCAAATCAGGGACAGC   | 540 | ACCACCGGCAACGTCGTCAAGC | 560 |     |
| 561 | TTCTGACACCAACTTCACAA  | 580 | TGAATATCCGCACTCACCGCC  | 600 |     |
| 601 | AAACAAAATTCCGCCGTTGG  | 620 | GCTTGACTTTGTTCTCGTCCC  | 640 |     |
| 641 | CGTCCAGCCCGAATCCACA   | 660 | GCGGATACTGTGACTGTGGAG  | 680 |     |
| 681 | TTCTGACAGCTTCTCTTAGCC | 700 | GTATTAGCATCGACGCCGAACA | 720 |     |
| 721 | ACAAACGATATCAAAAGCGT  | 740 | GCCCTTGGGATGTACACGACTA | 760 |     |
| 761 | CGACGGACAAAACGCCGAG   | 780 | GTTCCGGATCACCTATAACTCC | 800 |     |
| 801 | TCCACGAAGCTCTTTGCGG   | 820 | TTTCTCTGTTAAACCCTTCTA  | 840 |     |

【図3】

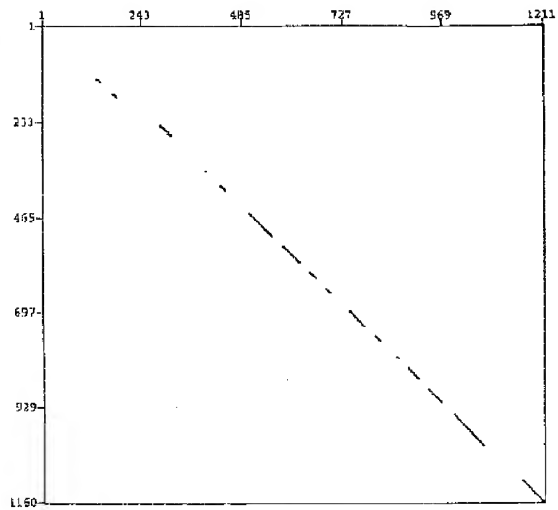
|      |                      |      |                        |      |     |
|------|----------------------|------|------------------------|------|-----|
| 841  | CGGGAAAGAGCAACGACGT  | 860  | CTCTACCACAGTGGAGCT     | 880  | GGA |
| 881  | GAAAGAAATTTACGACTGG  | 900  | GTGAGGGTTGGGTTCTCTGCC  | 920  |     |
| 921  | ACCTCAGGGGCTTATCAAT  | 940  | GGAGCTATGAAACGCACGACG  | 960  |     |
| 961  | TTCTCTCGTGGTCTTTTTTC | 980  | TTCCAAGTTGATCAATCTTAA  | 1000 |     |
| 1001 | GGACCAAAAATCTGAACGT  | 1020 | TGCAACATCGTCCTCAACAAAG | 1040 |     |
| 1041 | ATCCTCTAGACTCCAAAAA  | 1060 | CCACCTCCACTGTGACAGTCT  | 1080 |     |
| 1081 | CACCTCTCTTTTTTCCTGCT | 1100 | AATAATCTTCATCTGTCAACAC | 1120 |     |
| 1121 | AAACTAAAAATCTATAATAA | 1140 | ATAAAATGGAAAGCTCATATAT | 1160 |     |
| 1161 | TTACACAATCTACACTGCT  | 1180 | TATTATTACCATGCGTCTTA   | 1200 |     |
| 1201 | TTAGTGCAATAA         |      |                        |      | 3'  |

【図4】



大正金時とテンダーグリーンの比較

【図5】



ケンタッキーワンダーとテンダーグリーンの比較

---

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:19)